

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

2 759 377

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

97 01624

⑤1 Int Cl<sup>6</sup> : C 08 B 37/00, C 12 P 19/04, A 61 K 7/48, 7/50, A 23 L  
1/054 // (C 12 P 19/04, C 12 R 1:41)

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12.02.97.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 14.08.98 Bulletin 98/33.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du  
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : AGRO INDUSTRIE RECHERCHES  
ET DEVELOPPEMENTS ARD SOCIETE ANONYME —  
FR et CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE CNRS — FR.

⑦2 Inventeur(s) : ALAMI YOUNES, HEULIN THIERRY,  
MILAS MICHEL, DE BAYNAST REGIS, HEYRAUD  
ALAIN et VILLAIN AGNES.

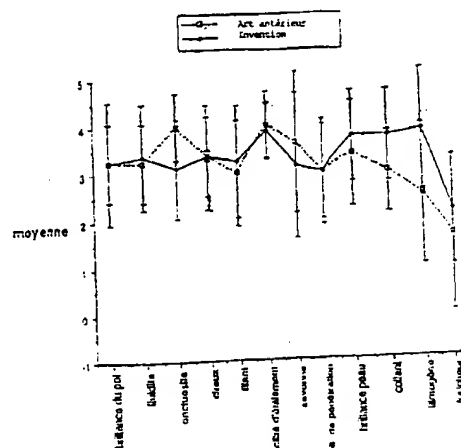
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : HAMMOND.

⑤4 POLYSACCHARIDE, MICRO-ORGANISME ET PROCEDE POUR SON OBTENTION, COMPOSITION LE  
CONTENANT ET APPLICATION.

⑤7 Polysaccharide ayant une unité de répétition qui pos-  
sède une chaîne latérale et comprend six sucres neutres  
dont le glucose et le galactose et un sucre acide, une solu-  
tion supérieure à 0, 2 % en poids dudit polysaccharide for-  
mant un gel élastique et transparent.

Application dans le domaine des industries cosméti-  
ques, alimentaires, pharmaceutiques, pétrolières.



FR 2 759 377 - A1



La présente invention concerne un nouveau polysaccharide, micro-organisme et procédé pour son obtention, composition le contenant et application.

On sait que les populations microbiennes constituent un large réservoir pour la mise en oeuvre de nouvelles molécules. La description des bactéries présentes dans les rhizosphères de plantes céréalières a d'abord permis de mettre en évidence des espèces fixatrices d'azote pour la plupart associées aux racines de blé, tournesol, riz et maïs. L'isolement de ces espèces a nécessité la mise au point de méthodes d'isolement spécifiques : « le modèle spermosphère » permettant de sélectionner les bactéries les plus adaptées à la rhizosphère et l'immunopréciipitation utilisant les anticorps spécifiques de certaines espèces. Ces bactéries sont aussi impliquées dans les mécanismes d'attachement et de colonisation des racines.

Depuis plusieurs années, les recherches se sont focalisées sur la capacité de la plupart des bactéries, présentes à la surface des racines et dans la rhizosphère, à produire des exopolysaccharides (EPS). Il a largement été démontré que ces polymères jouent un rôle dans la colonisation des racines par les bactéries et l'agrégation des sols autour des racines.

De récents travaux s'intéressent à l'étude de souches pour leur capacité à stimuler l'agrégation du sol autour des racines de tournesol et de blé.

Un objet de la présente invention est de fournir un micro-organisme produisant des exopolysaccharides sur milieu gélosé, à croissance rapide sur des milieux de culture peu exigeants à base de matières premières agricoles (hydrolysats de son de blé, peptides de blé, sirops de glucose, hydrolysats de co-produits d'amidonnerie par exemple), faciles à mettre en oeuvre et bien entendu non-pathogènes et génétiquement stables.

Ainsi, a été mise en évidence, une souche dont la cartographie et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S indiquent qu'elle appartient à la famille des Rhizobiacées (subdivision alpha des Protéobactéries). Le pourcentage de similarité des acides nucléiques de cette région du chromosome (ADNr 16S) de la souche YAS34 est de 97,2 % avec *Rhizobium elii* et de 96,2 % avec *Rhizobium leguminosarum* (souche LMG 9518). Une hybridation sur colonies de YAS34 avec une sonde oligonucléotidique spécifique des *Rhizobium* (*sensu lato*) dans le gène nodD s'est révélée positive (communication personnelle G. Laguerre, INRA, Dijon). La présence du gène nodD et les pourcentages de similarité du gène codant pour l'ARNr 16S avec des espèces appartenant au genre *Rhizobium* sont autant d'éléments permettant d'affirmer que la souche YAS34 est un *Rhizobium*.

L'empreinte génotypique de la souche YAS34 par rep-PCR en utilisant trois différents jeux d'amorce (REP, ERIC et BOX) est disponible.

YAS34 a été déposée sous le n° I-1809 à la CNCM de l'Institut Pasteur le 15 janvier 1997.

5            Cette souche YAS 34 a été isolée de la surface des racines (rhizoplan) d'un tournesol (*Helianthus annuus* cv Albena) prélevé au stade quatre feuilles. Les semences utilisées n'avaient pas été traitées à l'aide de produits phytosanitaires et avaient été stérilisées avant le semis. Le sol était de type limoneux dont le cation échangeable majoritaire est le calcium.

10           Cette souche YAS 34 est une bactérie Gram négative, aérobie catalase positive et oxydase négative. Il s'agit d'un bâtonnet mobile formant des colonies élastiques, translucides de couleur blanche sur milieu RCV-glucose (4 g/l).

15           La souche YAS 34 réalise la biosynthèse de polysaccharide par fermentation en présence d'un milieu de culture contenant une source de carbone préférentiellement assimilée.

Il a été mis en évidence que les sources carbonées, les plus performantes en terme de croissance et de production de polysaccharides, sont le glucose, le fructose, le saccharose et le galactose.

20           Cette aptitude à assimiler de nombreux glucides a conduit à étudier la capacité fermentaire de cette souche sur différents milieux d'origine végétale issus du fractionnement de matières agricoles comme le blé, la pomme de terre et le raisin. Dans le tableau I ci-après, sont regroupés les différents milieux testés, tandis que le tableau II indique les résultats obtenus.

TABLEAU I

PRODUITS AGRICOLES	MILIEUX TESTES	COMPOSITIONS SUCRES ET MATIERES AZOTEES
Pomme de terre	JCII ED : jus clair II électrodialysé	
Son de Blé	JPAS : jus de presse après saccharification	
	FAM : filtrat après microfiltration	Glucose : 12 à 15 g/L Matière azotée : 5,25 g/L
Raisin	JRB 033 ED LD : jus de presse de marc de raisin après électrodialyse	Glucose : 10 g/L Fructose : 10 g/L Matière azotée : traces

TABLEAU II

SUBSTRATS NATURELS	$\mu$ max (h <sup>-1</sup> )	DO à 600 nm max	VISCOSITE (cps à 25°C, 26 s <sup>-1</sup> )		CONSOMM. TOTALE GLUCOSE (g/L)
			à 52 h	à 140 h	
<b>Pomme de terre</b>					
JCII ED	0,21	7,6	238	273	5,6
JCII ED1/2	0,26	6,04	197	193	3,8
<b>Son de Blé</b>					
JPAS 2/3	0,17	3,9	267	374	9,5
FAM	0,47	2,9	280	356	5,6
<b>Marc de raisin</b>					
JRB 03 ED LD1/2	nd		9	36	1,8

5

Le milieu dénommé FAM issu du son de blé, qui renferme simultanément 12 g/L de glucose et 5,25 g/L de matière azotée, s'avère être le plus performant à la fois pour la croissance de la souche ( $\mu$  max 0,47 h<sup>-1</sup>) et la biosynthèse de polysaccharide (viscosité proche de 400 cps en fin de culture).

Il a été étudié différents milieux de synthèse dont notamment ceux de composition ci-après :

**RCVs**

	Glucose	20 g
5	Extrait de levure	1,72 g
	Solution tampon (2)	15 ml
	Solution minérale (1)	50 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l

**DSM**

10	Glucose	20 g
	Corn steep	5 g
	NaNO <sub>3</sub>	2 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
15	Solution E (3)	2,5 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l

Composition des solutions minérale (1), tampon (2) et E (3)

**(1) Solution minérale**

20	EDTA (tritréplex II)	0,4 g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 g
	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	2 g
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,44 g
	Solution éléments	20 ml
25	Eau osmosée	qsp 1 l

**Solutions éléments**

	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	430 mg
	MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1300 mg
30	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	750 mg
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2800 mg
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	22,5 mg
	CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	70 mg
	Eau osmosée	qsp 1 l

## (2) Solution tampon

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	40 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	60 g
Eau osmosée	qsp 1 l

5

## (3) Solution E

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3 g
FelII nitrate	1 g
$\text{MnSO}_4$	0,2 g
$\text{ZnCl}_2$	0,1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{CaCl}_2$	0,004 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Eau osmosée	qsp 1 l

10

15

## NA

Extrait de viande	3 g
Peptone	5 g
Eau osmosée	qsp 1 l

20

Le tableau III regroupe les résultats obtenus.

25

TABLEAU III

Milieu	Rapport C/N	DO à 600 nm max	$\mu$ max (h-1)	Viscosité finale à 26s-1, 20°C (cps)
RCV s	50	2,70	0,28	227
DSM+	8	6,20	0,38	254
NA	0,1	1,91	0,35	7

On peut remarquer d'après ce tableau III que les milieux riches en azote et carencés en carbone (C/N faible) tel que le milieu NA favorisent la croissance de

la souche mais ne permettent pas la production de polysaccharides. Par contre, les milieux RCV et DSM riches en substrats azotés et carbonés, réalisent le meilleur compromis en permettant à la fois une bonne croissance de la souche et la synthèse de polysaccharides. Ces essais ont également mis en évidence qu'il est possible de dissocier la croissance de la souche de la production de polysaccharides.

Il a été ainsi déterminé un milieu de préculture optimisé pour la croissance de la souche, dont la composition est pour un inoculum de 7,5 %.

#### Opt2\_ns

10	Glucose (stérilisé séparément)	20 g
	Extrait de levure	2,5 g
	Sulfate d'ammonium	1 g
	Sol. Minérale (1)	70 ml
	Sol. Tampon (2)	20 ml
15	Eau osmosée	qsp 1 l
	Inoculum	7,5 %

De même, il a été étudié la mise au point d'un milieu optimisé pour la production d'exopolysaccharide, afin de maximiser la productivité en polymère. La composition, ci-après dénommée MP1, a donc été définie comme la plus performante.

#### MP1

	Glucose	20 g
	Extrait de levure	1,7 g
25	Sol. Minérale (1)	70 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l

Dans le tableau IV, on a regroupé les résultats de croissance et de production en utilisant le milieu RCVs seul (référence) ou les deux milieux optimisés ci-dessus Opt2\_ns et MP1.

TABLEAU IV

PRECULTURE	Milieu	CYCLE REFERENCE	CYCLE OPTIMISE
		RCVs	Opt2_ns
	% inoculum	0,22	0,37
	DO corrigée 600 nm finale	0,6	1,6
	Durée	20 heures	15 heures
PRODUCTION	Milieu	RCVs	MP1
	$\mu$ max (h-1)	0,28	0,29
	DO corrigée 600 nm finale	8,9	9,2
	Concentration finale en EPS	10,1 g/l	10,2 g/l
	dS/dt Consommation en glucose	0,25 g/l.h	0,30 g/l.h
	dP/dt Productivité en EPS (phase de production)	0,27 g/l.h	0,36 g/l.h
	Viscosité à 25°C	1500 cps à 26s <sup>-1</sup>	1560 cps à 26s <sup>-1</sup>
	Durée fermentation	73 heures	63 heures
	Durée phase production	38 heures	28 heures
	Durée totale du cycle	93 heures	78 heures

5 Pour récupérer le polysaccharide produit par la souche par fermentation comme explicité ci-dessus, deux méthodes peuvent être utilisées.

Selon une première méthode, le moût brut est soumis à une précipitation à l'éthanol puis à un séchage sous vide pour obtenir un produit sec contenant le polysaccharide brut. Le produit obtenu, remis en solution à 1 %, a des propriétés viscosifiantes. Cette solution, chauffée à une température comprise entre



70 et 95°C (de préférence entre 85 et 95°C), présente les mêmes propriétés gélifiantes que la solution préparée à partir du polysaccharide purifié, qui est obtenu selon la seconde méthode ci-après.

Selon cette seconde méthode, on soutire le moût de fermentation et on le dilue entre 1 et 1/20, de préférence entre 1 et 1/10. Puis, on porte la solution obtenue à une température comprise entre 70 et 95°C ; de préférence, ce traitement thermique est réalisé, entre 85 et 95°C. En effet, un traitement thermique à une température de 90°C provoque une liquéfaction du moût de fermentation, même après refroidissement à température ambiante. Pour un traitement à 90°C pendant environ une heure, la température de gélification ou refroidissement est inférieure à 20°C.

Si le traitement thermique est réalisé à une température inférieure à 90°C, celui-ci conduit après refroidissement à l'obtention d'un produit plus visqueux que le moût initial.

Ainsi, il apparaît que de tels traitements thermiques permettent de faciliter la séparation cellules/polymères, notamment par centrifugation.

On centrifuge le produit issu du traitement thermique par exemple à 13000 g ou on le soumet à une filtration tangentielle.

Le surnageant ainsi obtenu est soumis à une filtration frontale à 0,2 µm sur un filtre à plaques. Une telle filtration frontale permet en effet d'obtenir un filtrat extrêmement pur présentant des densités optiques (DO) à 600 nm pratiquement nulles (Tableau V).

TABLEAU V

Seuil de coupure (µm)	DO à 600 nm du Filtrat
0,8	0,02
0,45	0,005
0,8 puis 0,45	0,007
0,8 puis 0,22	0,003
0,45 puis 0,22	0,002

Pression appliquée :  $2 \cdot 10^5$  Pascals

Le filtrat récupéré est traité de façon connue : il est concentré, soumis à une précipitation à l'éthanol puis à un séchage sous vide pour obtenir un produit sec comprenant un exopolysaccharide purifié.

5 Ainsi qu'il a été dit plus haut, cet exopolysaccharide est nouveau tant par sa nature que par ses propriétés.

La détermination de la structure du polysaccharide ainsi obtenu par spectre RMN est l'objet des figures 1 et 2. Ceci a permis de déterminer que l'unité de répétition, qui possède une chaîne latérale, est composée majoritairement de 7 sucres :

- 10                   - 6 sucres neutres dont le glucose et le galactose  
                    - 1 sucre acide

Il a été également mis en évidence la présence de substituants pyruvates et acétates. Les charges pyruvates et sucres acides confèrent à ce polysaccharide les propriétés de polyélectrolyte.

15 Lors de l'utilisation, pour des concentrations en polysaccharide de l'invention supérieures à 2 g/l, les solutions de ce dernier se transforment en gel. L'obtention du gel se fera par mise en solution dans l'eau ou dans toute solution aqueuse saline. Cette mise en solution est favorisée par un chauffage de la solution du polysaccharide de l'invention, de préférence supérieur à 60°C.

20 Le polysaccharide, selon la présente invention, présente en solution à 1 % une limpidité parfaite, de « qualité cristal », ce qui lui confère une position privilégiée par rapport à des produits connus tels que ceux commercialisés sous la marque AMIGEL par la société A. MULLER, ou sous la dénomination commerciale CURDLAN par la société TAKEDA, les xanthanes commercialisées par la société  
25 KELCO et alginates de sodium proposés par la société SANOFI (cf. Tableau VI ci-après).

TABLEAU VI

Produit	Coloration DO à 420 nm	Trouble DO à 600 nm	Do à 860 nm
Gel de l'invention	0,060	0,031	0,020
Amigel	1,200	0,958	0,742
Curdlan	1,232	1,601	1,629
Xanthane LT	0,302	0,187	0,124
Alginates de sodium	0,216	0,133	0,091

Par ailleurs, le polysaccharide selon l'invention présente par rapport à  
 5 ceux connus une remise en solution la plus rapide (Tableau VII).

TABLEAU VII

Produit	Type de poudre	Durée de remise en solution
Gel de l'invention	non mouillable	Qlq minutes
Amigel	mouillable	Qlq heures
Xanthane	non mouillable	Qlq dizaines de minutes

10

L'étude des propriétés mécaniques des gels de polysaccharide selon  
 l'invention a permis de montrer la forte élasticité de ce gel : la figure 3 est relative à  
 l'influence de la fréquence (Hz) sur les modules élastiques  $G'$  et de perte  $G''$  et sur  
 la viscosité complexe  $\eta^*$  d'un gel de polysaccharide selon l'invention (la  
 15 concentration en polysaccharide est de 0,10 g/l et celle de NaCl de 0,1 M).

De même, il a été étudié l'incidence de la force ionique sur le module  
 élastique des gels à 1% (poids/poids) en polysaccharide : la figure 4 est relative à  
 l'influence de la concentration en sel (NaCl) sur le module élastique, mesuré à la  
 fréquence de 0,13 Hz, d'un gel de polysaccharide selon l'invention à une  
 20 concentration de 10 g/l.

On constate qu'à partir d'une concentration en NaCl supérieure à 0,04  
 M, on obtient un gel élastique dont les caractéristiques ne varient quasiment plus  
 avec la concentration en sel au moins jusqu'à 0,4 M. Des modules très voisins sont

obtenus en présence de  $\text{CaCl}_2$ . Les gels formés sont thermoréversibles pour des traitements thermiques inférieurs à  $90^\circ\text{C}$  : la figure 5 est relative à l'influence de la température sur les modules élastiques  $G'$  et de perte  $G''$  et sur la viscosité complexe  $\eta^*$  d'un gel de polysaccharide selon l'invention (la concentration en polysaccharide étant de 10g/l et celle en NaCl de 0,10 M).

Les résultats obtenus sont cependant fonction de la température et du temps de traitement, avec une possible destruction du gel pour des températures et/ou des temps de traitement trop élevés. La température de fusion du gel dépend très peu de la force ionique et de la nature des ions ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  par exemple).

Ce comportement rhéologique en milieu salé est extrêmement intéressant, car il offre des perspectives d'applications dans de nombreux secteurs de l'industrie reliés aux 3 milieux naturellement salés :

- le goût (env. 1,5 g sel/L) :
  - l'eau physiologique (env. 7,5 g sel/L) :
  - le milieu marin (env. 25 g sel/L) :
- domaine alimentaire,  
secteur de l'agriculture, la  
cosmétique, la phar-  
macie...,  
industries pétrochim-  
iques, cosmétique (gam-  
me marine), etc...

Afin d'illustrer ces différents domaines, des exemples d'application et de formulation du polysaccharide selon la présente invention sont indiqués ci-après sans toutefois présenter un caractère limitatif.

### I. Cosmétique

Le polysaccharide selon la présente invention trouve des applications en tant que :

- agent hydratant, seul ou en mélange avec des hydratants déjà connus, tels que l'acide hyaluronique, dans des crèmes et des laits,
- agent épaississant et agent de texture dans des lotions, des toniques, des crèmes et des laits (cosmétique blanche),
- agent de suspension et agent texturant dans des gels gommants, des filtres solaires,
- agent gélifiant dans des gels coiffants, des gels avant et après rasage, des gels lavants (shampooings et bains moussants).

Ci-après sont indiqués quelques types d'application.

#### **Crème hydratante (% pds/pds matière sèche)**

- émulsifiant

4 %

	- conservateur	0,5 %
	- glycérol	5 %
	- polysaccharide de l'invention	0,25 %
	- NaCl	0,5 %
5	- eau QSP	100 %

Pour cette application, le polysaccharide de l'invention apporte des propriétés particulièrement intéressantes par rapport à certains produits concurrents, au niveau de l'onctuosité, de la facilité d'étalement et de la fraîcheur. Des effets notables sur la diminution du pouvoir filant, du pouvoir collant, de l'effet filmogène, de la brillance de la peau et de la fluidité ont été observés, ainsi que le montre la figure 6.

#### **Lotion démaquillante (% pds/pds matière sèche)**

	- Dodécyl-tétradécyl galacturonate de sodium	0,5 %
15	- Hyaluronate de sodium	0,2 %
	- Polysaccharide de l'Invention	0,4 %
	- Eau de bleuet	5,0 %
	- Conservateur	QS
	- Parfum, colorant	QS
20	- Eau QSP	100,0 %

#### **Gel gommant (% pds/pds matière sèche)**

	- Polysaccharide de l'invention	0,75 %
	- NaCl	0,5 %
25	- Carboxyméthylcellulose	0,5 %
	- Noyau d'abricot broyé	2,0 %
	- Conservateur, colorant, parfum	QS
	- Eau QSP	100,0 %

#### **Gel Lavant (% pds/pds matière sèche)**

30	- Décyl-dodécyl galacturonate de sodium	4,0 %
	- Lauryl bétaine	3,0 %
	- Laureth(2)sulfate	3,0 %
	- Acylat peptides (C12)	2,0 %
35	- Mono/oligycéride d'acide capric/caprilique éthoxylé	1,0 %

	- Disodium lauryl sulforsuccinate	1,0 %
	- Polysaccharide de l'invention	0,5 %
	- NaCl	0,25 %
	- Conservateur, parfum, colorant	QS
5	- Eau QSP	100,0 %

## II-Détergents

Le polysaccharide selon la présente invention, trouve des applications  
 10 en tant que :

- \* agent texturant et agent de suspension dans des crèmes et des gels récurants.
- \* agent gélifiant dans des gels déodorants et désinfectants.
- \* agent de texture dans des liquides vaisselle.

Dans le cas d'une crème récurante, une formulation possible est :

15	- Polysaccharide de l'invention	1,0 %
	- NaCl	0,5 %
	- Silicate d'aluminium calciné	25,0 %
	- Sodium laurylsulfate	5,0 %
	- Capryloamphopropionate	1,0 %
20	- Conservateur, colorant, parfum	QS
	- Eau QSP	100,0 %

## III-Alimentation

Le polysaccharide, selon la présente invention, trouve des applications  
 25 en tant que :

- \* agent de texture, agent gélifiant et agent de suspension dans les desserts lactés, les vinaigrettes, les sauces (mayonnaise ou autres), les gelées et confitures, les aspics et terrines.
- 30 \* agent texturant dans les boissons diététiques, les confiseries.

Par exemple, une formulation pour réaliser un flan chocolaté à froid ( %  
 pds/pds matière sèche) est :

	- Lait UHT	83,0 %
	- Polysaccharide de l'invention	1,2 %
35	- NaCl	0,1 %
	- Sucre	8,0 %

	- Cacao	3,0 %
	- Lait écrémé en poudre	2,0 %
	- Huile végétale	0,7 %
	- Arôme vanille	QS
5	- Oeufs	2,0 %

#### IV-Fermentation

Dans ce domaine, le polysaccharide, selon la présente invention, apporte la texture gélifiée à des milieux de culture gélosés semi-solides. Un exemple  
10 de formulation pour milieu gélosé semi-solide est en % pds/pds de matière sèche :

	- Peptones	1 %
	- Glucose	0,5 %
	- NaCl	0,5 %
	- Polysaccharide de l'invention	0,75 %
15	- Eau QSP	100 %

#### V-Agriculture

En agriculture, le polysaccharide, selon la présente invention, trouve des applications en tant que :

- 20 \* agent d'agrégation des sols,  
\* agent rétenteur d'eau, contribution au maintien du potentiel hydrique des sols et agent de protection de la sécheresse,  
\* agent d'enrobage de semences.

Ainsi, l'inoculation de la souche Rhizobium sur des semences de tour-  
25 nesol permet d'obtenir une forte colonisation des racines que le sol ait été ou non préalablement stérilisé (respectivement 90 % et 10 % de la microflore totale). Les conséquences de cette inoculation concernent l'augmentation de la masse de sol adhérent aux racines (+ 50 %) et la modification de la porosité de ce sol rhizosphérique (augmentation de la macroporosité). Ces résultats semblent indiquer  
30 que l'exopolysaccharide produit par la souche YAS 34, d'une part, contribue à l'assemblage des agrégats du sol (effet « collant ») et de ce fait augmente la fréquence des pores de transfert de l'eau vers la plante et, d'autre part, retient l'eau dans une phase polysaccharide gélifiée.

Pour confirmer le rôle rétenteur d'eau du polymère, des mélanges « sol  
35 + 1 % polysaccharide purifié » ont été réalisés. Les résultats montrent que à pF 2,5

(capacité au champ), le polysaccharide augmente de 50 % la rétention d'eau du sol et de la même façon, l'apport de polymère (1 %) se traduit par la nécessité d'appliquer deux fois plus d'énergie pour déshydrater le sol.

Les figures ci-après sont jointes en annexe :

- 5     Figure 1   - Polysaccharide de l'invention désacétylé. Spectre RMN<sup>1</sup>H (300 MHz),  
                  solution dans D<sub>2</sub>O, T = 358°K
- Figure 2   - Polysaccharide de l'invention. Spectre RMN<sup>1</sup>H (300 MHz), solution  
                  dans D<sub>2</sub>O, T = 358°K
- 10    Figure 3   - Influence de la fréquence sur les modules élastique (G') et de perte  
                  (G'') et sur la viscosité complexe n\* du gel du polysaccharide de  
                  l'invention. Concentration en polysaccharide 10 g/L, concentration en  
                  NaCl 0,1 M.
- Figure 4   - Influence de la concentration en sel (NaCl) sur le module élastique,  
                  mesuré à la fréquence 0,13 Hz, d'un gel du polysaccharide de  
15                l'invention à la concentration de 10 g/L.
- Figure 5   - Influence de la température sur les modules élastique (G') et de perte  
                  (G'') et sur la viscosité complexe n\* du gel du polysaccharide de  
                  l'invention. Concentration en polysaccharide 10 g/L, concentration en  
                  NaCl 0,1 M.
- 20    Figure 6   - Test sensoriel comparatif entre une formule de crème hydratante de  
                  l'art antérieur (art antérieur) et une formule de crème hydratante de  
                  l'invention (invention) comprenant 0,25 % d'un polysaccharide de  
                  l'invention et du chlorure de sodium.

25    Enfin, le polysaccharide, selon la présente invention, trouve aussi des applications  
         en tant qu'agent texturant, agent épaississant et agent de suspension dans les  
         peintures.



## REVENDEICATIONS

- 5                    1. Polysaccharide ayant une unité de répétition qui possède une chaîne latérale et comprend six sucres neutres dont le glucose et le galactose et un sucre acide, une solution supérieure à 0,2 % en poids dudit polysaccharide formant un gel élastique et transparent.
- 10                   2. Polysaccharide selon la revendication 1, caractérisé par le fait que sa mise en solution est quasi instantanée.
- 15                   3. Polysaccharide selon la revendication 1, caractérisé par le fait qu'en solution dans l'eau à une concentration de 0,2 % en poids et en présence de sel, il forme un gel élastique, transparent et suspensif.
- 20                   4. Micro-organisme capable de synthétiser un polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé par le fait qu'il est un *Rhizobium* déposé sous le n° I-1809 auprès de la CNCM.
- 25                   5. Procédé pour la production d'un polysaccharide selon l'une quelconque des revendications 1 ou 3, caractérisé par le fait qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) culture d'un micro-organisme sur un milieu riche en glucose et en matière azotée,
- b) récupération du moût de fermentation,
- c) obtention directe du polysaccharide brut par précipitation.
- 30                   6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le moût de fermentation issu de l'étape b) est traité comme suit :
- d) traitement thermique dudit moût après dilution, à une température comprise entre 70 et 95°C,
- e) centrifugation,
- f) filtration du surnageant issu de l'étape d), par exemple, par filtration frontale
- 35

g) traitement du filtrat pour obtenir le polysaccharide sous forme sèche.

7. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait qu'à l'étape a), on utilise deux milieux de culture l'un dit de préculture et l'autre dit de production.

5

8. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le milieu dit de préculture a pour composition :

	Glucose (stérilisé séparément)	20 g
	Extrait de levure	2,5 g
10	Sulfate d'ammonium	1 g
	Solution Minérale (1)	70 ml
	Solution Tampon (2)	20 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l
	Inoculum	7,5 %

15

9. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le milieu dit de production a pour composition :

	Glucose	20 g
	Extrait de levure	1,7 g
20	Sol. Minérale (1)	70 ml
	Eau osmosée	qsp 1 l

10. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le traitement thermique est réalisé à une température entre 70 et 95°C.

25

11. Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le micro-organisme est un Rhizobium déposé sous le n° I-1809 auprès de la CNCM.

30

12. Application du polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 3, en tant qu'agent hydratant (seul ou en mélange avec d'autres hydratants déjà connus tels que l'acide hyaluronique), agent épaississant, agent gélifiant, agent de suspension dans le domaine de la cosmétique.

35

13. Application du polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 3, en tant qu'agent gélifiant, agent de suspension dans le domaine de la détergence.

14. Application du polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 3 en tant qu'agent texturant et agent de suspension dans les produits alimentaires.

5 15. Application du polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 3 en tant qu'agent gélifiant dans des milieux de fermentation gélosés.

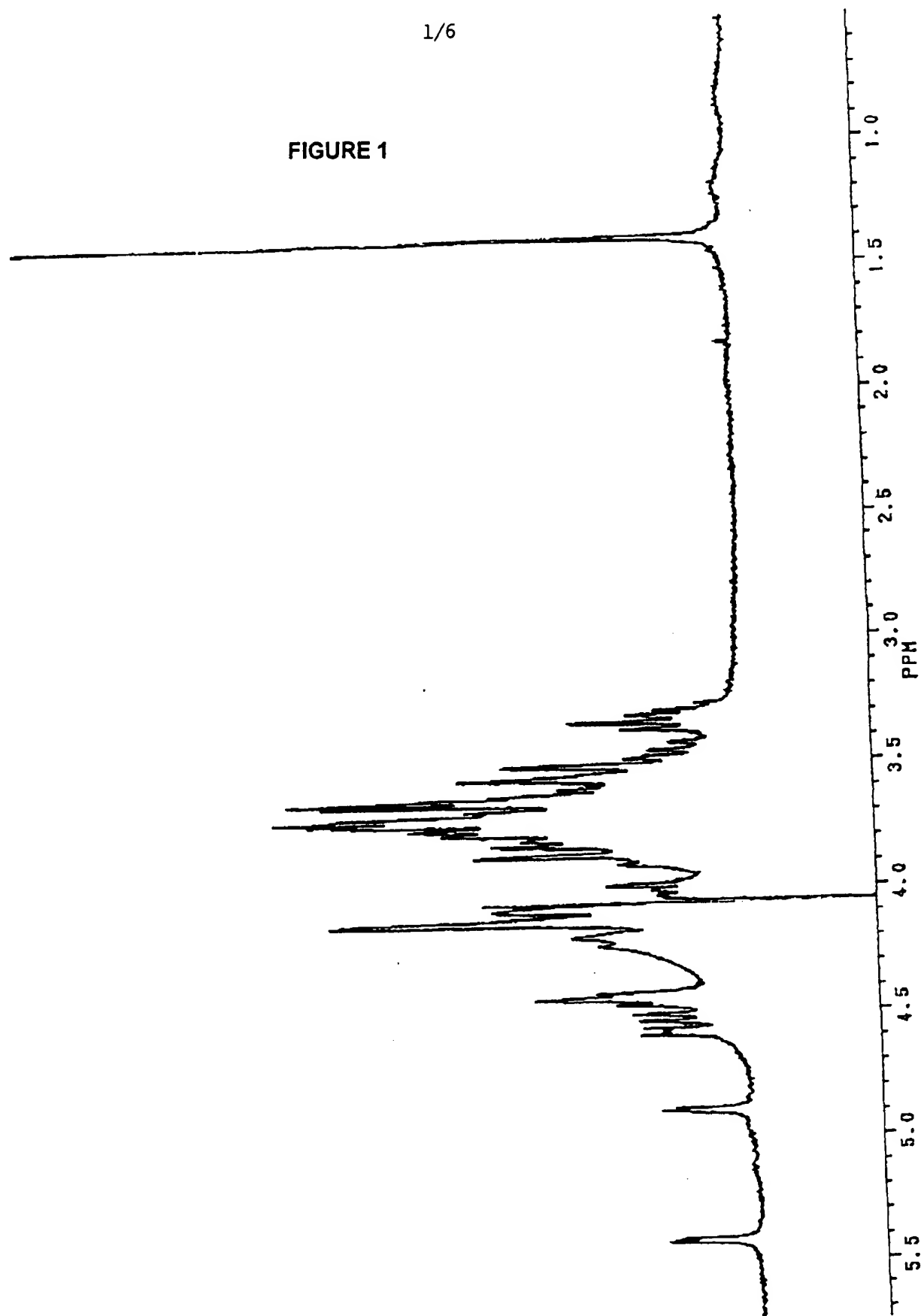
10 16. Application du polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 3 en tant qu'agent d'agrégation des sols, agent rétenteur d'eau et agent d'enrobages de semences dans le domaine de l'agriculture.

15 17. Application du polysaccharide selon l'une des revendications 1 à 3 en tant qu'agent texturant, agent épaississant et agent de suspension dans les peintures.

18. Application du polysaccharide selon la revendication 6, en tant qu'agent épaississant, agent gélifiant, agent de suspension, agent texturant et agent rétenteur d'eau.

1/6

FIGURE 1



2/6

FIGURE 2

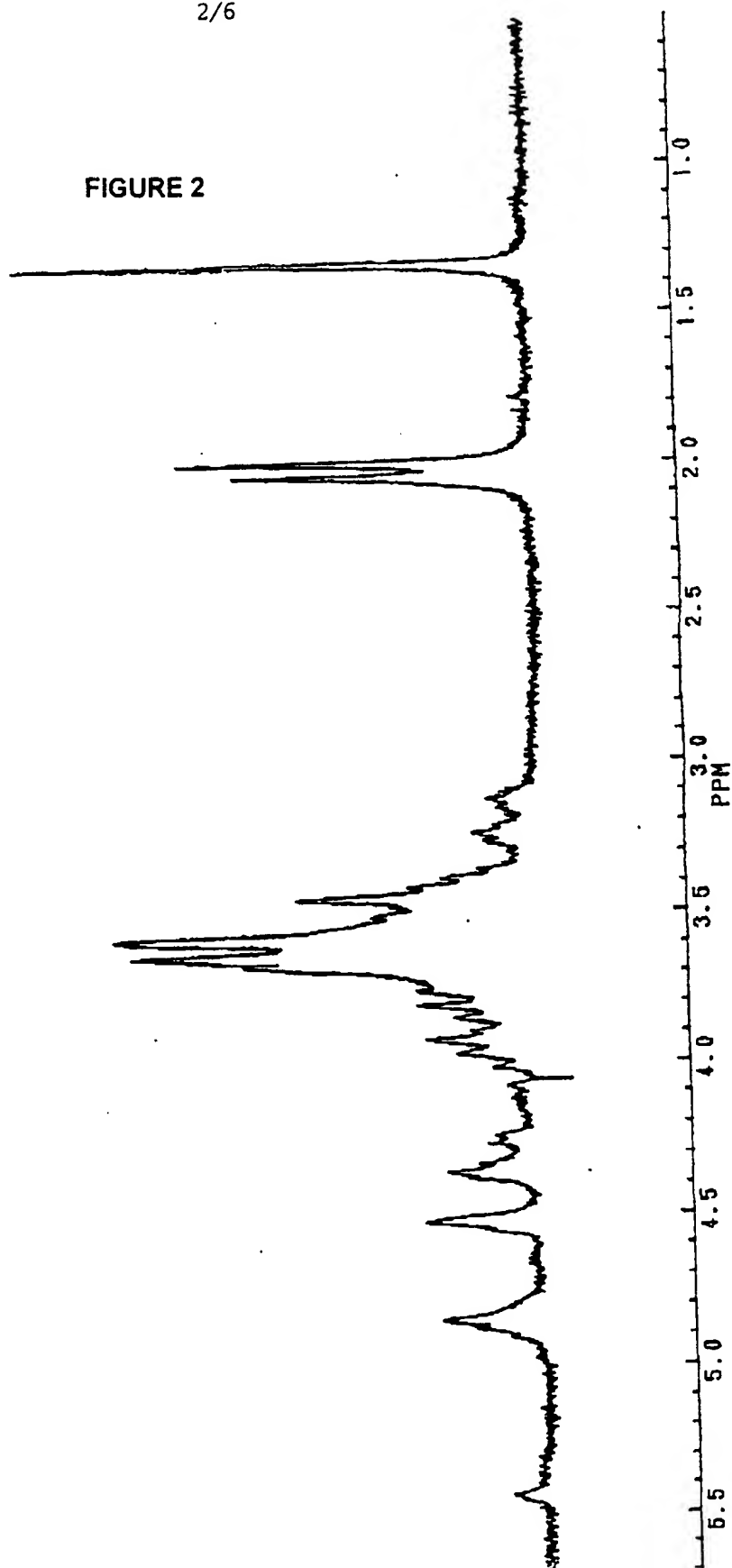


FIGURE 3

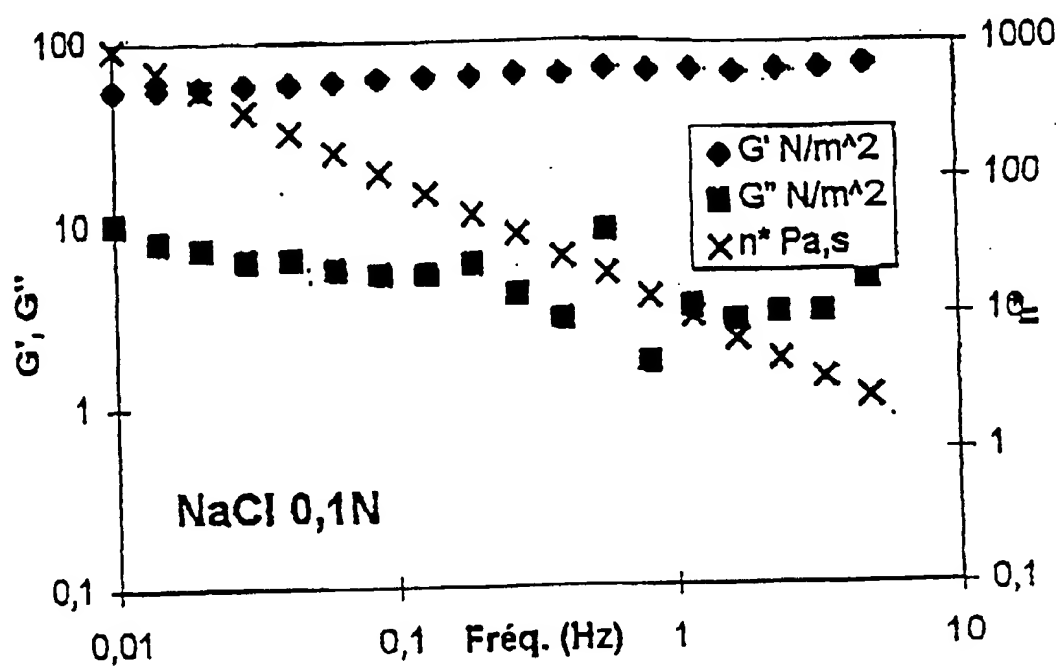


FIGURE 4

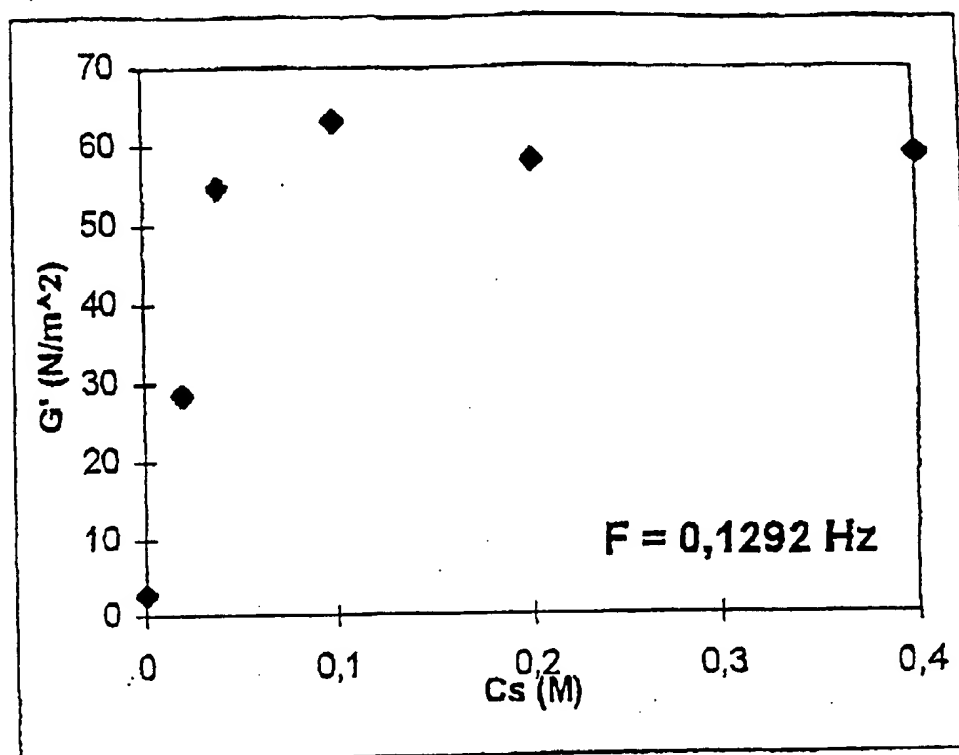


FIGURE 5

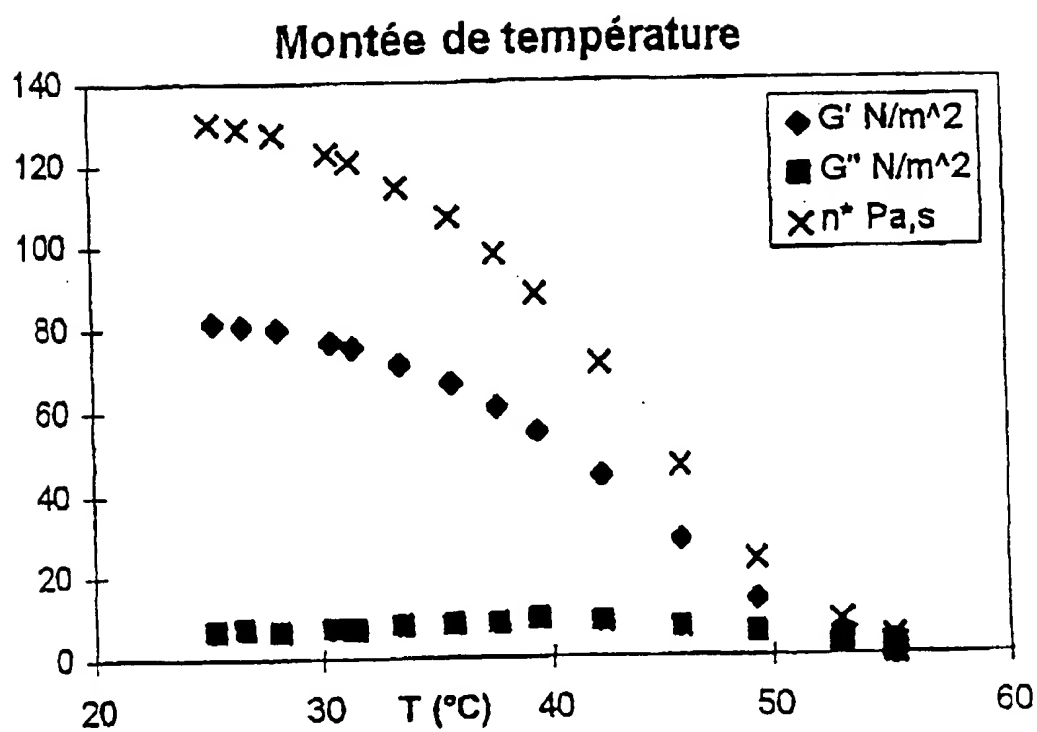
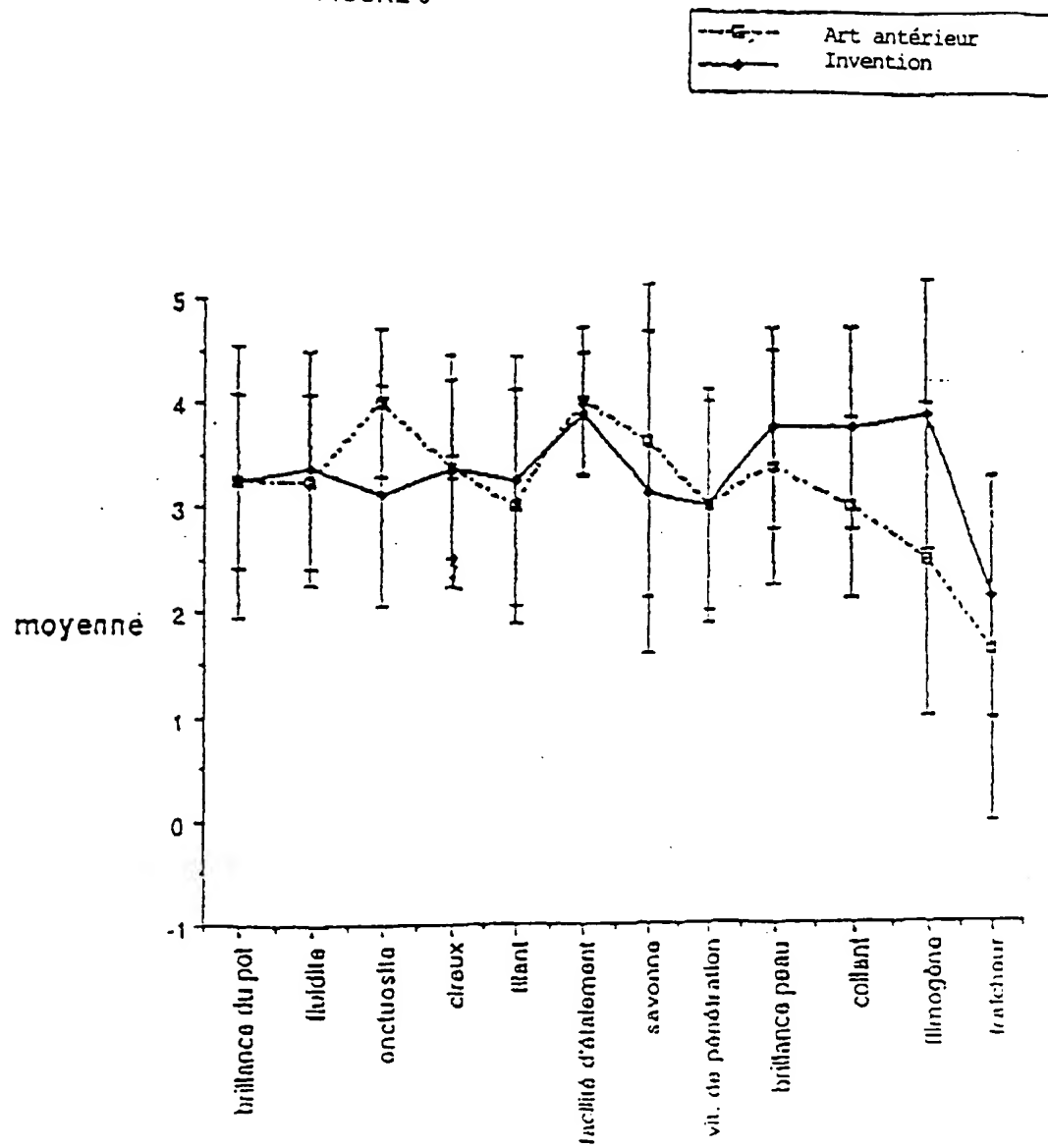




FIGURE 6



REPUBLIQUE FRANÇAISE

2759377

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE  
PRELIMINAIRE  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 540756  
FR 9701624

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP 0 534 855 A (ELF SANOFI) 31 mars 1993  * abrégé * * page 6, ligne 6 - ligne 12 * ---	1-3,5-7, 10,12, 14,16-18
A	GB 2 223 503 A (AGRICULTURAL & FOOD RESEARCH COUNCIL) 11 avril 1990 ---	
A	DATABASE WPI Week 9019 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-145127 XP002045240 & JP 02 092 901 A (NAKANO VINEGAR CO LTD) , 3 avril 1990 * abrégé *	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 007, no. 235 (C-191), 19 octobre 1983 & JP 58 127701 A (BAIORISAACHI CENTER:KK), 29 juillet 1983, * abrégé * -----	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C08B C12P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
30 octobre 1997		Mazet, J-F
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)